

REC'D

2003

PCT 2003/000666



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA

ESTADO ESPAÑOL



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

REC'D 19 MAR 2004  
WIPO PCT

# CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200300054, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 10 de Enero de 2003.

Madrid, 29 de Enero de 2004

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica.

P.D.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "CARMEN LENCE REIJA".

CARMEN LENCE REIJA

## INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

P200300054

## (1) MODALIDAD

 PATENTE DE INVENCIÓN MODELO DE UTILIDAD

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

'03 ENE 10 12:04

## (2) TIPO DE SOLICITUD:

- ADICIÓN A LA PATENTE  
 SOLICITUD PROVISIONAL  
 CAMBIO DE MODALIDAD  
 TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA  
 PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

## (3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN

MODALIDAD

N.º SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

## (4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

L 218

## (5) SOLICITANTES: APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
CLÍNICA Y MOLECULAR DEL CÁNCER  
DE PULMÓN

NOMBRE

NACIONALIDAD  
ESPAÑOLACÓDIGO PAÍS  
ESDNI/CIF  
G 61922704

CNAE

PYME

## (6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO VILLAROEL 251, PRAL. 2<sup>a</sup>

TELÉFONO

LOCALIDAD BARCELONA

FAX

PROVINCIA

CORREO ELECTRÓNICO

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

CÓDIGO POSTAL

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

108036

CÓDIGO PAÍS

ES

CÓDIGO PAÍS

ES

## (7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

- 1- ROSELL COSTA  
 2- TARON ROCA

ESPAÑOLA  
ESPAÑOLACÓDIGO  
ES  
ES

## (8)

 EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

## (9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

 EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O EL ÚNICO INVENTOR INVENC. LABORAL CONTRATO SUCESIÓN

## (10) TÍTULO DE LA INVENCION:

"DISPOSITIVO DE ENSAYO DE POLIMORFISMOS DEL GEN XPD/ERCC2 PARA LA CORRECTA ADMINISTRACIÓN DE QUIMIOTERAPIA EN CÁNCER DE PULMÓN"

## (11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

 SI  NO

## (12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:  
PAÍS DE ORIGENCÓDIGO  
PAÍS

NÚMERO

FECHA

## (14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/1986 DE PATENTES

## (15) AGENTE/REPRESENTANTE NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO)(RELLÉNENSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

· ALFONSO DIEZ DE RIVERA ELZABURU (578(9)) Colegiado número 397

Miguel Ángel 21 28010 - Madrid España

## (16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

- DESCRIPCIÓN N.º DE PÁGINAS: 20  
 N.º DE REIVINDICACIONES: 9  
 DIBUJOS. N.º DE PÁGINAS: 14  
 LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS: 3  
 RESUMEN  
 DOCUMENTO DE PRIORIDAD  
 TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

- DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN  
 JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD  
 HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA  
 PRUEBAS DE LOS DIBUJOS  
 CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN  
 OTROS Disquete

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

ALFONSO DIEZ DE RIVERA ELZABURU  
por mi compañero

(VER COMUNICACIÓN AL DORSO)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

## NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión;  
 para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art.81 del R.D. 2245/1986.



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200300054

FECHA DE PRESENTACIÓN

10 ENE. 2003

## RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

**Dispositivo de ensayo de polimorfismos del gen XPD/ERCC2 para la correcta administración de quimioterapia en cáncer de pulmón.**

La invención se adscribe al sector técnico del tratamiento del cáncer de pulmón por parte de fármacos anti-tumorales y, en concreto, desarrolla un dispositivo de diagnóstico que permite tratar a cada paciente con el fármaco más efectivo según el polimorfismo que presenten para el gen XPD.

El dispositivo de ensayo de la invención se basa en las variantes polimórficas del gen XPD en el exon 23 (A-C, Lys 751 Gln) y en el exon 10 (G-A, Asp312Ans) y en el desarrollo de cebadores específicos que permitan detectar dichos polimorfismos por PCR o mediante secuenciación automática de ADN.

GRÁFICO

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



(12)

## SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

P20<sup>(2)</sup>0300054 NÚMERO DE SOLICITUD

(31) NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

(32) FECHA

(33) PAÍS

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN

'10 ENE. 2003

(62) PATENTE DE LA QUE ES  
DIVISIONARIA

(71) SOLICITANTE (S) FUNDACION PARA LA INVESTIGACION CLINICA  
Y MOLECULAR DEL CANCER DE PULMON

DOMICILIO Villaroel 251, Pral. 2<sup>a</sup>,  
Barcelona 08036, España

NACIONALIDAD española

(72) INVENTOR (ES)

RAFAEL ROSELL COSTA Y MIGUEL TARON ROCA

(51) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(54) TÍTULO DE LA INVENCION

"DISPOSITIVO DE ENSAYO DE POLIMORFISMOS  
DEL GEN XPD/ERCC2 PARA LA CORRECTA ADMI-  
NISTRACION DE QUIMIOTERAPIA EN CANCER  
DE PULMON"

(57) RESUMEN

Dispositivo de ensayo de polimorfismos del gen XPD/ERCC2 para la correcta administración de quimioterapia en cáncer de pulmón.

La invención se adscribe al sector técnico del tratamiento del cáncer de pulmón por parte de fármacos anti-tumorales y, en concreto, desarrolla un dispositivo de diagnóstico que permite tratar a cada paciente con el fármaco más efectivo según el polimorfismo que presenten para el gen XPD.

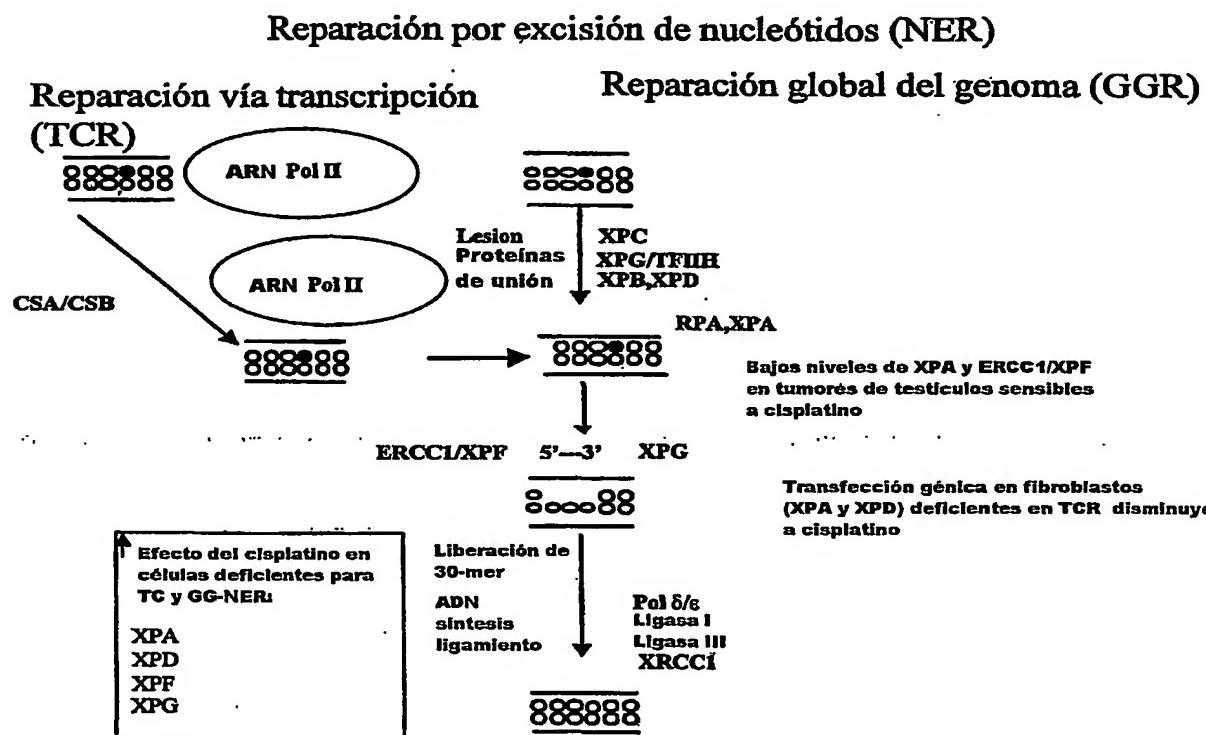
El dispositivo de ensayo de la invención se basa en las variantes polimórficas del gen XPD en el exon 23 (A-C, Lys 751 Gin) y en el exon 10 (G-A, Asp312Ans) y en el desarrollo de cebadores específicos que permitan detectar dichos polimorfismos por PCR o mediante secuenciación automática de ADN.

**Dispositivo de ensayo de polimorfismos del gen XPD/ERCC2 para la correcta administración de quimioterapia en cáncer de pulmón**

**Ambito de la invención**

- 5 La invención se adscribe al sector técnico del tratamiento del cáncer de pulmón por parte de fármacos antitumorales y, en concreto, desarrolla un dispositivo de diagnóstico que permite tratar a cada paciente con el fármaco más efectivo según el polimorfismo que presenten para el gen XPD.
- 10 **Estado de la Técnica**
- Diversos fármacos antitumorales lesionan el ADN de forma similar al que efectúan los carcinógenos. La unión covalente del carcinógeno o de un fármaco antitumoral citotóxico depara la formación de una base del ADN que se altera químicamente, lo que se conoce con el término de aducto (Philips,2002). El cisplatino causa uniones entre las cadenas del ADN y tales aductos proporcionan la acción citotóxica del cisplatino (Siddik,2002). Los sistemas de reparación del ADN son esenciales para la eliminación de los aductos de cisplatino. El *Nucleotide Excision Repair* (NER) es la principal vía para proteger al huésped del desarrollo de un cáncer de pulmón y al mismo tiempo es el principio de generación de resistencia al cisplatino. De hecho, tanto los aductos del benzopireno diol epóxido (BPDE) y también los aductos del cisplatino bloquean de forma eficaz la ARN polimerasa II y de este modo anulan la transcripción (Hanawalt,2001). Estas lesiones del ADN se eliminan por el sistema NER que a su vez se subdivide en dos vías metabólicas: *Transcription Coupled Repair* (TCR) y *Global Genomic Repair* (GGR) (Esquema 1). De manera importante el TCR (o TC-NER) repara las lesiones que bloquean la transcripción en la hebra que transcribe el ADN de genes activos, mientras que el GGR (o GG-NER) repara las lesiones en la hebra que no transcribe en los genes activos y también en el genoma sin función de transcripción (Cullinane et al,1999; May et al,1993; McKay et al,1998).

Esquema 1: Representación de las vías de reparación de excisión de nucleótidos (NER)



En los seres humanos, el NER es un mecanismo fundamental de defensa contra los efectos carcinogénicos de la luz solar y ciertos defectos genéticos en las vías reparadoras causan graves consecuencias en trastornos hereditarios autosómicos recesivos, como es el xeroderma pigmentosum (XP). En efecto, los pacientes con esta enfermedad sufren 5 hipersensibilidad a la luz solar con una extraordinaria susceptibilidad y alta frecuencia de padecer cáncer cutáneo. En el XP, hay siete grupos complementarios que pueden ser deficientes en las vías del NER. Estos genes se enumeran del XPA al XPG. En la enfermedad XP, estos genes son defectuosos en ambas vías del NER (Conforti et al,2000). En cáncer de ovario y en menor frecuencia, en cáncer de colon y cáncer de 10 pulmón, se ha observado pérdida de heterocigosisidad en diversos genes XP (Takebayashi et al, 2001). La pérdida de heterocigosisidad se relaciona con la pérdida de transcripción y la deficiencia de estos genes conlleva un aumento de sensibilidad al cisplatino, como se ha observado en el cáncer de ovario. El síndrome de Cockayne (CS) es otra enfermedad fotosensitiva que se vincula a déficit en el sistema NER. Dos genes se han identificado, el 15 CSA y el CSB. Las alteraciones de dichos genes perturban las funciones que se involucran en la vía TCR (Conforti et al,2000).

En la parte izquierda del Esquema 1 (modificada de Rajewsky y Müller, 2002) se muestra la vía TCR que es esencial para detectar el daño que causa el cisplatino (Cullinane et al,1999). En el momento de la transcripción, cuando el ARN polimerasa II 20 detecta la lesión, los factores específicos de transcripción CSA y CSB se activan en la vía molecular del NER (Furuta et al, 2002; McKay et al, 2001). Los genes XP también se involucran en la vía TCR, tal como se muestra en el recuadro del Esquema 1. En esencia, diversos déficits moleculares en ambas vías (GGR y TCR) en fibroblastos confieren un incremento de la sensibilidad al efecto citotóxico de cisplatino en comparación al que 25 ocurre en fibroblastos normales. Importante, cualquier déficit en alguno de los genes XPA, XPD, XPF o XPG confiere un incremento sustancial de la actividad del cisplatino (Furuta et al, 2002).

Como principio común, el elenco de citotóxicos que se usan en el tratamiento del cáncer, en particular en cáncer de pulmón, se vertebran alrededor del uso del cisplatino o carboplatino en asociación a otro fármaco tal como la gencitabina, docetaxel, paclitaxel 30 o vinorelbina como más importantes y de uso clínico habitual. Sin embargo, los

resultados de la quimioterapia en cáncer de pulmón metastásico son muy limitados con una mediana de tiempo a la progresión que no rebasa los cinco meses y una mediana de supervivencia que no excede de los ocho o diez meses. Ningún tipo de combinación sobresale en mejorar tales expectativas de supervivencia. Sin embargo, de forma individual, como comprobación clínica, suele constatarse que casos individuales tienen supervivencias significativamente más largas. Los polimorfismos que son simples cambios de nucleótidos, confieren diferencias interindividuales que alteran la función o la expresión de genes. Tales polimorfismos que existen en una proporción muy elevada en el genoma están todavía en vías de estudio. Es posible que en un futuro se caractericen más de 3000 polimorfismos que sean útiles para determinar la susceptibilidad a cáncer, el valor pronóstico de la enfermedad y el valor predictivo de respuesta al tratamiento. A nivel de expresión del ARN mensajero se ha constatado que la sobreexpresión del gen ERCC1 que actúa en la vía GGR provoca resistencia al cisplatino en cáncer gástrico, de ovario y de pulmón (Lord et al, 2002; Metzger et al, 1998; Shirota et al, 2001).

Los polimorfismos XPD se han vinculado a una disminución de la capacidad reparadora del ADN en diversos estudios (Spitz et al, 2001). En efecto, aproximadamente la mitad de la población poseen el genotipo Lys751Lys y también tienen el genotipo homocigoto normal Asp312Asp. Tales pacientes o personas con genotipo homocigoto normal, tienen muy buena capacidad reparadora y por lo tanto pueden ser resistentes al cisplatino (Bosken et al, 2002). La elevación de la capacidad reparadora que se puede medir mediante ensayos funcionales se ha asociado a resistencia al cisplatino en cáncer de pulmón de célula no pequeña (*non small cell lung cancer*, NSCLC) (Zeng-Rong et al, 1995). La capacidad reparadora también se ha estudiado mediante la medición de la reactivación de un gen dañado por exposición al BPDE y los niveles de capacidad reparadora son significativamente más bajos en enfermos con cáncer de pulmón que en controles (Wei et al, 1996,2000). Múltiples estudios señalan que la merma de la capacidad reparadora y el incremento en los niveles de aductos del ADN incrementa el riesgo de cáncer de pulmón. Así, la expresión basal de genes críticos en la vía NER guarda relación con el riesgo de cáncer de pulmón. Por RT-PCR, los niveles de transcritos de ERCC1, XPB, XPG, CSB y XPC, fueron medidos en linfocitos de 75 enfermos con cáncer de pulmón y 95 controles. Los resultados mostraron un decremento

significativo en los niveles de expresión de XPG y CSB en los casos de cáncer de pulmón en comparación con los controles (Cheng et al, 2000). Muy importante, los niveles de ARN mensajero en linfocito de los genes XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG, ERCC1 y CSB demostró una correlación muy significativa en los niveles de ARN mensajero entre 5 ERCC1 y XPD, a su vez, la expresión de ambos genes se correlaciona con la capacidad reparadora del ADN (Vogel et al, 2000).

Existen patentes (WO 97/25442) acerca de métodos de diagnóstico del cáncer de pulmón, así como de otros tipos de tumores (WO 97/38125, WO 95/16739) basadas en la detección de otros polimorfismos diferentes a los aquí descritos. Asimismo hemos 10 localizado otras patentes que también utilizan la detección de polimorfismos en otros genes para conocer la respuesta de determinados pacientes a otros fármacos (estatinas); pero no conocemos patentes que determinen qué pacientes con cáncer de pulmón son más proclives a un tratamiento antitumoral o a otro.

15. **Bibliografía**

1. Aloyz R, Xu ZY, Bello V, et al. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD. *Cancer Res* 2002; 62:5457-5462
2. Bosken CH, Wei Q, Amos CI, Spitz MR:An analysis of DNA repair as a determinant 20 of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:1091-1099
3. Cheng L, Guan Y, Li L, et al. Expression in normal human tissues of five nucleotide excision repair genes measured simultaneously by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cancer epidemiology biomarkers & prevention* 1999; 25 8:801-807
4. Cheng L, Guan Y, Li L, et al. Expression in normal human tissues of five nucleotide excision repair genes measured simultaneously by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 8:801-807, 1999
5. Cheng L, Sptiz MR, K Hong W, Wei K. Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 2000; 30 21: 1527-1530

6. Cheng L, Sptiz MR, K Hong W, Wei K. Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis* 21: 1527-1530, 2000
7. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Sptiz MR, Wei Q. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2002; 94:393-397
8. Conforti G, Nardo T, D'Incalci M, Stefanini M: Proneness to UV-induced apoptosis in human fibroblasts defective in transcription coupled repair is associated with the lack of Mdm2 transactivation. *Oncogene* 2000; 19:2714-2720
9. Cullinane C, Mazur SJ, Essigmann JM, et al: Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cell extracts by cisplatin DNA damage. *Biochemistry* 1999; 38: 6204-6212
10. Furuta T, Ueda T, Aune G, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res.* 62:4809-4902, 2002
11. Furuta T, Ueda T, Aune G, et al: Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 2002; 62:4899-4902
12. Hanawalt PC: Controlling the efficiency of excision repair. *Mut Res* 2001;485:3-13
13. Hou S-M, Fält S, Angelini S, et al: The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002;23:599-603
14. Lord RVN, Brabender J, Gandara D, et al: Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2286-2291
15. May A, Nairn RS, Okumoto DS, et al: Repair of individual DNA strands in the hamster dihydrofolate reductase gene after treatment with ultraviolet light, alkylating agents, and cisplatin. *J Biol Chem* 1993;268:1650-1657
- 25 16. McKay BC, Becerril C, Ljungman M: p53 plays a protective role against UV-and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. *Oncogene* 2001; 20:6805-6808

17. McKay BC, Ljungman M, Rainbow AJ: Persistent DNA damage induced by ultraviolet light inhibits p21<sup>waf1</sup> and bax expression: implications for DNA repair, UV sensitivity and the induction of apoptosis. *Oncogene* 1998; 17:545-555
18. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al: ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 1998; 16:309-316
- 5 19. Phillips DH: The formation of DNA adducts. In: Alison MR, ed. *The Cancer Handbook*. London: Nature Publishing Group; 2002:293-307
- 10 20. Rajewsky MF, Müller R. DNA repair and the cell cycle as targets in cancer therapy. In: Alison MR, ed. *The Cancer Handbook*. London: Nature Publishing Group 2002; 1507-1519
- 15 21. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al: ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19:4298-4304.
22. Siddik ZH: Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents: DNA-interactive alkylating agents and antitumour platinum-based drugs. In: Alison MR, ed. *The Cancer Handbook*. London: Nature Publishing Group; 2002:1295-1313
- 20 23. Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 61:1354-1357, 2001
24. Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al: Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001; 61:1354-1357
- 25 25. Takebayashi Y, Nakayama K, Kanzaki A, et al: Loss of heterozygosity of nucleotide excision repair factors in sporadic ovarian, colon and lung carcinomas: implication for their roles of carcinogenesis in human solid tumors. *Cancer Letters* 2001; 174:115-125
26. Vogel U, Dybdahl M, Frentz G, et al. DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutat Res*. 461:197-210, 2000

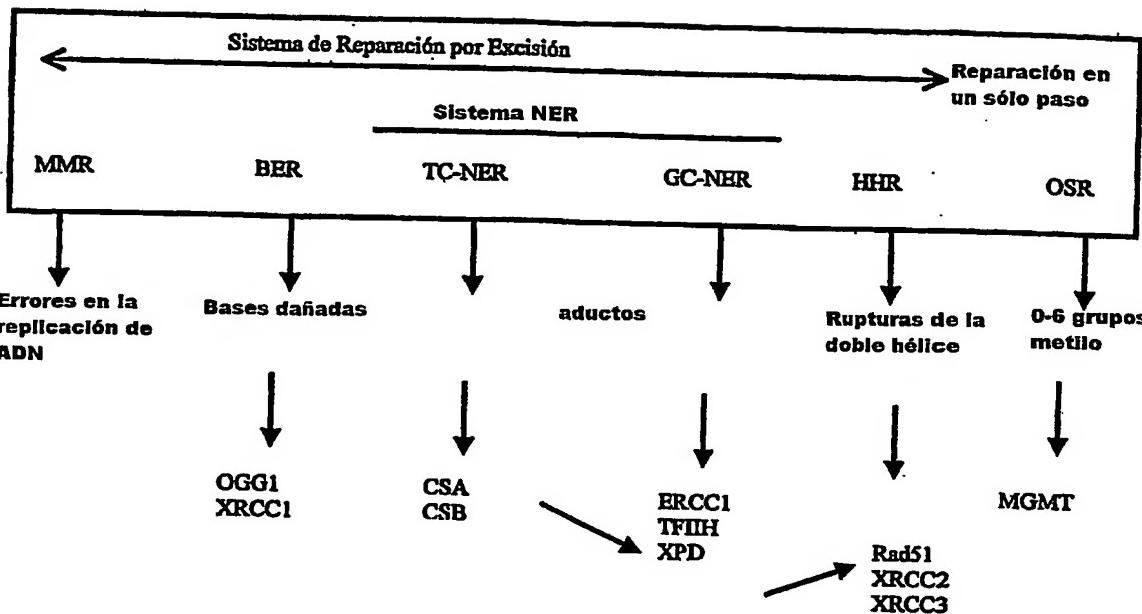
27. Wei Q, Cheng L, Amos CI, et al. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 1764-1772
28. Wei Q, Cheng L, Ki Hong W, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung 5 cancer patients. Cancer Res 1996; 56:4103-4107
29. Zeng -Rong N, Paterson J, Alpert P, et al. Elevated DNA capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. Cancer Res 1995; 55:4760-4764.

**Breve descripción de la invención**

10 En nuestra investigación hemos descubierto el valor predictivo farmacogenético de las variantes polimórficas del gen XP. Hemos investigado los polimorfismos de gen XPD en el exon 23 (A-C, Lys751Gln) y en el exon 10 (G-A,Asp312Ans). Las figuras 1 y 2 muestran dos ejemplos de identificación de los polimorfismos XPD en los codones 312 y 751 respectivamente realizado por secuenciación automática. El Esquema 2 muestra las 15 diversas vías metabólicas de reparación del ADN y la posición que ocupa en dichas vías el gen XPD. El interés clínico en examinar el polimorfismo XPD queda reforzado , puesto que en un cribaje de un panel de líneas celulares de diversos tumores del National Cancer Institute revela que entre XPA, XPB, XPD y ERCC1 solamente la sobreexpresión de XPD se correlaciona con resistencia a los agentes alquilantes (Aloyz et al, 2002).

20

Esquema 2. Sistemas de Reparación de DNA



#### Descripción detallada de la invención

5 Tipificación de los polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn del gen humano XPD/ERCC2.

#### 1.- Información génica del locus ERCC2/XPD

10 La información de la secuencia de ADN, ARN y proteína correspondientes a este gen está detallada en la página web [www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink/refseq.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/locuslink/refseq.html) con número de Locus ID: 2068, y que se resume a continuación:

**ERCC2/XPD** – excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D).

**NCBI Secuencias de Referencia (RefSeq):**

mARN: NM\_000400

Proteina: NP\_000391

GenBank Fuente: X52221, X52222

5 mARN: NM\_000400

Proteina: NP\_000391

**GenBank Nucleotide Secuencias:**

Nucleotídica: L47234 (tipo g), BC008346 (tipo m), X52221 (tipo m), X52222  
(tipo m)

10 **Otros Enlaces:**

OMIM: 126340

UniGene: Hs 99987

**2.- Muestras biológicas para la obtención de ADN**

15 El ADN utilizado para la tipificación de los dos polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn ha sido obtenido de células nucleadas procedentes de sangre periférica.

Cabe destacar que para la obtención del ADN y posterior tipificación igualmente puede utilizarse cualquier otro tipo celular nucleado del organismo humano.

20 **3.- Extracción de sangre**

Se recoge sangre periférica en tubos tipo vacutainer que contienen K<sub>3</sub>/EDTA (Becton Dickinson Systems; referencia número 36752 o 368457). A continuación se centrifuga durante 15 minutos x 2.500 rpm a temperatura ambiente y se descarta la fracción plasmática. Sobre la fracción celular se añaden 2 volúmenes de solución de lisis de eritrocitos (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 0,1mM EDTA, 10mM Hepes, pH=7,4) y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos en una plataforma giratoria. A continuación se

centrifuga la muestra durante 10 minutos x 3.000 rpm a temperatura ambiente, se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular obtenido en 1 ml de solución de lisis de eritrocitos. Se repite la centrifugación de 10 minutos x 3.000 rpm a temperatura ambiente y se descarta el sobrenadante. El precipitado obtenido corresponde  
5 a la fracción celular libre de eritrocitos.

#### 4.- Extracción de ADN

A partir de las células nucleadas de sangre periférica se procede a la extracción y purificación del ADN mediante el kit comercial QIAamp® DNA blood Mini kit (Qiagen; 10 referencia 51104 o 51106) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 5.- Tipificación de los polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn.

Para la tipificación del polimorfismo Asp312Asn del exón 10 se han utilizado las siguientes condiciones de PCR (volumen final de reacción de 25 µl): 900nM de cebador  
15 SEQ ID NO 1: ACGCCCACCTGGCCA, 900nM cebador SEQ ID NO 2: GGCGGGAAAGGGACTGG, 300nM sonda Taqman MGB™ VIC SEQ ID NO 3: CCGTGCTGCCGACGAAGT TAMRA, 300nM sonda Taqman MGB™ 6-FAM SEQ ID NO 4: CCCGTGCTGCCAACGAAG TAMRA, 12,5 µl de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; referencia 4304437) y 200ng de ADN. Los ciclos de PCR (50°C x 2 minutos, 95°C x 10 minutos, [92°C x 15 segundos, 60°C x 1 minuto] x 40 ciclos) y el análisis del polimorfismo se han realizado en un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando el programa Allelic Discrimination (Applied Biosystems).

Para la tipificación del polimorfismo Lys751Gln del exón 23 se han utilizado las siguientes condiciones de PCR (volumen final de reacción de 25 µl): 900nM de cebador  
25 SEQ ID NO 5: GCCTGGAGCAGCTAGAATCAGA, 900nM cebador SEQ ID NO 6: CACTCAGAGCTGCTGAGCAATC, 300nM sonda Taqman MGB™ VIC SEQ ID NO 7: TATCCTCTGCAGCGTC TAMRA, 300nM sonda Taqman MGB™ 6-FAM SEQ ID NO 8: CTATCCTCTTCAGCGTC TAMRA, 12,5 µl Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; referencia 4304437) y 200ng de ADN. Los ciclos de PCR (50°C x 2 minutos, 95°C x 10 minutos, [92°C x 15 segundos, 60°C x 1 minuto] x 40 ciclos) y el

análisis del polimorfismo se han realizado en un equipo ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando el programa Allelic Discrimination (Applied Biosystems).

En ambos casos el diseño de los cebadores y las sondas se realizó mediante el 5 programa informático PrimerExpress™ (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del proveedor y utilizando la secuencia de ADN de referencia anteriormente descrita. La especificidad de los cebadores y de las sondas fueron previamente testadas mediante el programa informático BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) . En todos los casos, tanto los cebadores como las sondas mostraron especificidad única sobre cada una 10 de las dos regiones a estudiar del gen ERCC2/XPD.

#### **6.- Validación del análisis mediante secuenciación automática de ADN**

Como validación de los resultados obtenidos se secuenciaron los fragmentos de ADN correspondientes a los polimorfismos Lys751Gln y Asp312Asn en 100 muestras 15... de ADN que previamente se habían analizado (ver apartados anteriores).

En primer lugar se amplificó mediante la técnica de PCR el fragmento del exón 10 del gen XPD/ERCC2 donde mapa el polimorfismo Asp312Asn. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes (volumen final de 50 µl): 0,25 µM cebador SEQ ID NO: 1, 0,25 µM del cebador SEQ ID NO: 2, 5 µl de buffer de PCR (67mM Tris-HCl, 20 16,6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1%-Tween 20) (Ecogen; referencia ETAQ-500), 1mM MgCl<sub>2</sub> (Ecogen; referencia ETAQ-500), 0,12mM PCR Nucleotide Mix (Roche; referencia 1581295), 1 unidad de EcoTaq ADN Polymerase (Ecogen; referencia ETAQ-500) y 200ng de ADN. Los ciclos de PCR utilizados fueron: 95°C x 5 minutos, [94°C x 30 segundos, 60°C x 45 segundos, 72°C x 1 minuto] x 35 ciclos, 74° x 7 minutos.

25 En segundo lugar se amplificó mediante la técnica de PCR el fragmento del exón 23 del gen XPD/ERCC2 donde mapa el polimorfismo Lys751Gln. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes (volumen final de 50 µl): 0,25 µM cebador SEQ ID NO: 6, 0,25 µM del cebador SEQ ID NO: 7, 5 µl de buffer de PCR (67mM Tris-HCl, 16,6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1%-Tween 20) (Ecogen; referencia ETAQ-500), 1mM MgCl<sub>2</sub> (Ecogen; referencia ETAQ-500), 0,12mM PCR Nucleotide Mix (Roche; referencia 30 1581295), 1 unidad de EcoTaq ADN Polymerase (Ecogen; referencia ETAQ-500) y

200ng de ADN. Los ciclos de PCR utilizados fueron: 95°C x 5 minutos, [94°C x 30 segundos, 64°C x 45 segundos, 72°C x 1 minuto] x 35 ciclos, 74° x 7 minutos.

La integridad de los productos de PCR fue analizada después de electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%-TBE, y posterior tinción con bromuro de etidio 1% en un 5 transiluminador de UV.

Los productos de PCR obtenidos se utilizaron para la reacción de secuenciación tal y como se detalla a continuación: en primer lugar se purifican los productos mediante la adición de 4 µl ExoSap-IT (USB ; referencia 7820) a 10 µl del producto de PCR correspondiente y se incuba de forma secuencial a 37°C x 45 minutos y a 80°C x 15 10 minutos. A 500-600 ng de producto de PCR purificado se añaden 4 µl de la solución BigDye Terminator version 3,0 (Applied Biosystems; referencia 439024801024) y 3,2 pmoles del cebador correspondiente (en este caso se utilizaron en reacciones por separado los mismos cebadores que los utilizados en la amplificación por PCR, tanto forward como reverse). Los ciclos de PCR para esta reacción de secuenciación fueron: 94°C x 5 15 minutos, [96°C x 10 segundos, 50°C x 5 segundos, 60°C x 4 minutos] x 32 ciclos.

Una vez finalizada la reacción de secuenciación los productos se precipitan mediante la adición de 62,5 µl de Etanol 96%, 3 µl de buffer acetato sódico 3M pH=4,6 y 24,5 µl de agua bidestilada. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugan durante 30 minutos x 14.000 rpm a temperatura ambiente, se 20 descarta el sobrenadante y se realiza un lavado con 250 µl de Etanol 70%. A continuación se centrifugan las muestras durante 5 minutos x 14.000 rpm a temperatura ambiente, se descartan los restos de etanol (dejando secar completamente los precipitados), y se añade 15 µl de buffer de carga TSR (Applied Biosystems; referencia 401674). Finalmente se 25 incuban a 95°C durante 3 minutos de forma previa a su inyección en el equipo automático capilar ABI Prism 310 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Los resultados de la secuenciación automática fueron analizados con el programa Sequencing Analysis 4.3.1 (Applied Biosystems).

En todos los casos analizados, los dos polimorfismos de cada una de las muestras fue secuenciado tanto con el cebador forward como con el cebador reverse, siendo en 30 todos los casos los resultados coincidentes entre ellos y también con los resultados obtenidos por análisis en PCR cuantitativa en tiempo real.

## Resultados

Desde agosto del 2001 se iniciaron, con el propósito de confirmar que las variantes alélicas del XPD podían influenciar una supervivencia tras tratamiento con quimioterapia en cáncer de pulmón metastásico tres estudios en enfermos con cáncer de pulmón metastásico. Estos tres estudios distintos son el primero con gemcitabina y cisplatino, el segundo con vinorelbina y cisplatino y el tercero con docetaxel y cisplatino. También se han analizado de forma retrospectiva 100 pacientes con cáncer de pulmón localmente avanzado que efectuaron quimioterapia neoadyuvante y luego cirugía. También se han analizado alrededor de 150 pacientes en estadios iniciales que recibieron tratamiento bien con cirugía sola o con quimioterapia preoperatoria o postoperatoria y cuyo resumen también se incluye en el apéndice.

Los datos más significativos hasta la fecha son los que se obtienen del estudio de enfermos con cáncer de pulmón estadio IV que recibieron tratamiento con gemcitabina y cisplatino. Entre agosto del 2001 y julio del 2002 se incluyeron 250 enfermos de los cuales se disponen datos definitivos en 109. La Tabla I adjunta describe las características clínicas de estos pacientes que son las habituales en relación a la edad, el estado general, la histología, las metástasis. En la Tabla II se observan las frecuencias de los distintos polimorfismos. También se ha analizado el polimorfismo del gen ERCC1 en la posición 118. Se observa que las frecuencias de los polimorfismos XPD en el exon 23 y 10 constata que los genotipos homocigotos normales constituyen el 50% mientras que las variantes heterocigotas son el 40% (Tabla II). En las siguientes figuras, de forma seriada, se presenta la supervivencia global de los 109 enfermos con una mediana de supervivencia de 10.7 meses en un rango de 8.9-12.5 (Figura 3). Las diferencias según el polimorfismo del gen ERCC1 no resultan significativas (Figura 4). Sin embargo, cuando se analiza la supervivencia en función del polimorfismo XPD en el codón 751 se constata que la mediana de supervivencia para 59 pacientes con el genotipo Lys/Lys es 10.7 meses, mientras que es muy superior y todavía no se ha alcanzado la mediana en 40 pacientes heterocigotos Lys/Gln (Figura 5). También se descubre que un grupo minoritario de pacientes (10) son homocigotos para la variante Gln/Gln, la mediana de supervivencia es de 2.1 ( $p=0.0009$ ) (Figura 5). Las mismas diferencias significativas se observan para el codón 312, véase la figura correspondiente ( $p=0.003$ ) (Figura 6). Del

mismo modo, cuando se analiza el tiempo a la progresión, globalmente, la mediana del tiempo a la progresión es de 4 meses en un rango de 3.2-4.8 (Figura 7). No hay diferencias según el genotipo ERCC1 (Figura 8). Sin embargo, en función del genotipo, en el codon 751 se observan grandes diferencias, de tal modo que los 59 pacientes que  
5 son Lys/Lys, la mediana es de 2.9 meses, mientras que los 40 pacientes Lys/Gln la mediana se incrementa a 7.4 meses. La diferencia es muy significativa ( $p=0.03$ ) (Figura 9). También se presenta el tiempo a la progresión del polimorfismo XPD en el codon 312, donde la diferencia en la supervivencia no resulta significativa (Figura 10). Las conclusiones de este estudio son reveladoras al diferenciar dos subgrupos de pacientes,  
10 unos con una respuesta y una supervivencia muy superior a la global donde la gemcitabina y cisplatino obtiene grandes resultados, mientras otro grupo de pacientes, dicho tratamiento estaría claramente contraindicado a la luz de los resultados tan exiguos, muy por debajo de las medianas de supervivencia que se aceptan normalmente.

**Tabla I. Características Clínicas de pacientes tratados con Gem/Cis**

No. Pacientes	109
Edad, años (Medicina, rango)	61 35-82
Estado clínico (Performance Status)	
0-1	89(81.7)
2	20(18.3)
Histología	
Adenocarcinoma	52(47.7)
SCC	37(33.9)
LCUC	5(4.6)
Otros	15(13.8)
Fase	
IIIb	29(26.6)
IV	80(73.4)
Efusión Pleural	19(17.4)
Cirugía	10(9.2)
Radioterapia	11(10.1)
Metástasis	
Hígado	9(8.3)
Pulmón	43(39.4)
Hueso	21(19.3)
SNC	16(14.7)
Adrenal	18(16.5)
Pie	7(6.4)
Nódulos linfáticos	23(21.1)
Otros	13(11.9)

Tabla II. Respuesta y genotipos ERCC1 y XPD

5

Respuesta	
Respuesta completa	5(5.3)
Respuesta parcial	29(30.9)
Respuesta completa +	34(36.2)
Respuesta parcial	
Enfermedad estable (Stable Disease)	14(14.9)
Progresiva Enfermedad (Progressive Disease)	46(48.9)
No Evaluable	15
ERCC1	
T/T	14(12.8)
C/T	52(47.7)
C/C	43(39.4)
XPD23	
Lys/Lys	59(54.1)
Lys/Gln	40(36.7)
Gln/Gln	10(9.2)
XPD10	
Asp/Asp	51(46.8)
Asp/Asn	48(44)
Asn/Asn	10(9.2)

En un segundo estudio en cáncer de pulmón estadio IV, que también se inició en agosto del 2001, se han analizado cerca de 100 enfermos tratados con cisplatino y vinorelbina y de los cuales se dispone de resultados preliminares. El efecto de la vinorelbina en función del genotipo XPD revela que los pacientes Lys/Lys con mal pronóstico cuando se tratan con gemcitabina y cisplatino, en este caso, cuando se utiliza vinorelbina ocurre lo contrario y se obtiene un tiempo a la progresión de 10 meses en el grupo de pacientes Lys/Lys cuando en el estudio que se tratan con gemcitabina y cisplatino, dicha median de tiempo a la progresión es de tan solo 2.9 meses. Véase las correspondientes gráficas 11 y 12.

Finalmente se muestran también los resultados del polimorfismo XPD en pacientes con cáncer de pulmón localmente avanzado, estadio III, donde una vez más

varía la supervivencia en función del genotipo. Al añadir docetaxel a la combinación de gemcitabina y cisplatino, el tiempo a la progresión resulta significativamente superior en los pacientes homocigotos Lys/Lys o Lys/Lys más Asp/Asp. Véase las figuras correspondientes 13 y 14.

5

### **Aplicación clínica**

Estos resultados señalan de forma inequívoca por primera vez, la predicción farmacogenética individual de los enfermos con cáncer de pulmón. En primer lugar, el genotipo XPD Lys751Gln predice un efecto y una supervivencia sustancialmente superior 10 a la normal cuando se tratan con gemcitabina y cisplatino. En segundo lugar, dicha combinación está claramente contraindicada en los otros genotipos Lys751Lys y Gln751Gln. Los resultados clínicos también demuestran que los pacientes Lys751Lys responden muy favorablemente a la combinación de vinorelbina y cisplatino o de docetaxel y cisplatino. Finalmente y en tercer lugar, se identifica que un grupo 15 minoritario de pacientes con el genotipo Gln751Gln tienen muy mala supervivencia a cualquier combinación de quimioterapia con cisplatino y por lo tanto, se deben tratar con combinaciones sin cisplatino.

El test genético del polimorfismo XPD es absolutamente necesario para la adecuada selección de fármacos antes de la administración de la quimioterapia en 20 pacientes con cáncer y muy especialmente en cáncer de pulmón.

### **Descripción de las Figuras**

Figura 1: Polimorfismo XPD 312 con sustitución G → A que causa un cambio de aminoácido Asp → Asn en el codón 312.

25 Figura 2: Polimorfismo XPD 751 con sustitución A → C con cambio de aminoácido Lys → Gln en el codón 751.

Figura 3: Abscisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia global a Gem/Cis.

Figura 4: Abscisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia según genotipo ERCC1.

30 Figura 5: Abscisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia según XPD 751.

Figura 6: Abscisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Supervivencia según XPD 312.

- Figura 7: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Tiempo a la progresión.
- Figura 8: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo ERCC1.
- Figura 9: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD 751.
- Figura 10: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD  
5 312.
- Figura 11: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD  
751 para vinorelbina/cisplatino.
- Figura 12: Abcisas: meses; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD  
751 para gemcitabina/cisplatino.
- 10 Figura 13: Abcisas: semanas; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipo XPD  
751 para Gem/Cis/Docetaxel.
- Figura 14: Abcisas: semanas; Ordenadas: Probabilidad. Progresión según genotipos XPD  
751 y 312.

.15

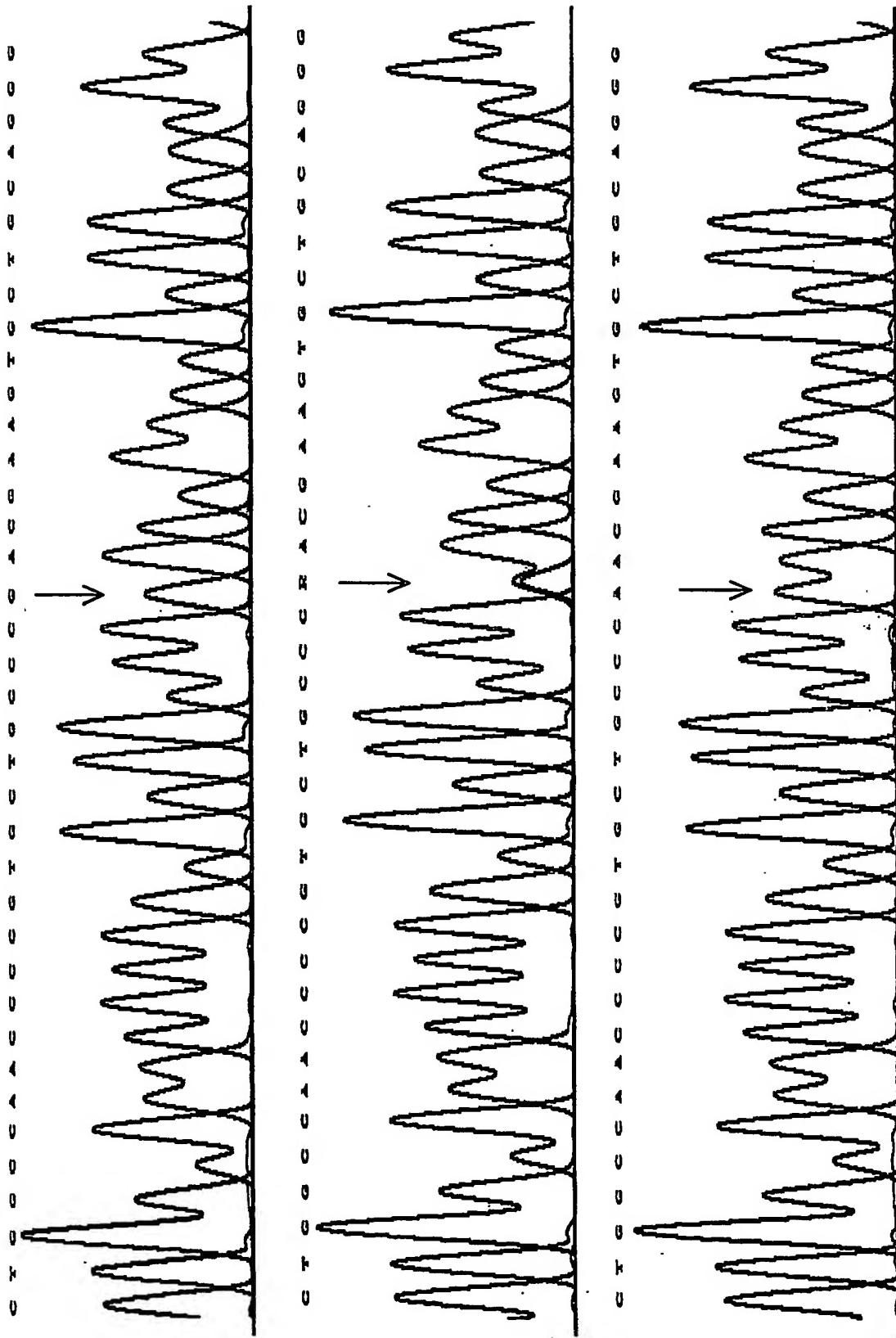
REIVINDICACIONES

- 1.- Dispositivo de ensayo para detección la predisposición genética a responder al tratamiento de fármacos antitumorales útiles para el cáncer de pulmón, basado en la  
5 detección de polimorfismos y/o pérdida de heterozigosis en el gene reparador ERCC2/XPD, cuyo locus está definido por la secuencias de GenBank X52221 y X52222, caracterizado por comprender al menos una de las sondas oligonucleotídicas seleccionadas entre SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.
- 10 2.- Dispositivo de ensayo, caracterizado porque las sondas se usan como cebadores de mapeo de muestras de ADN humano en técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- 15 3.- Dispositivo de ensayo, caracterizado porque las sondas se usan como cebadores de mapeo de muestras de ADN humano en técnica de secuenciación automática.
- 20 4.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por detectar los polimorfismos Lys751Gln o Asp312Asn, respectivamente para cada par de cebadores.
- 5.- Dispositivo de ensayo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el fármaco antitumoral es una combinación de cisplatino con un segundo compuesto antitumoral seleccionado entre gemcitabina, vinorelbina o docetaxel.
- 25 6.- Oligonucleótidos cebadores para detectar la predisposición genética a la respuesta a fármacos antitumorales, caracterizados por las secuencias representadas por SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6.
- 30 7.- Oligonucleótidos según la reivindicación 6 caracterizados porque el fármaco antitumoral es una combinación de cisplatino con un segundo compuesto antitumoral seleccionado entre gemcitabina, vinorelbina o docetaxel.

8.- Uso como cebadores para detectar la predisposición genética a la respuesta a fármacos antitumorales de los oligonucleótidos representados por SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:8.

5

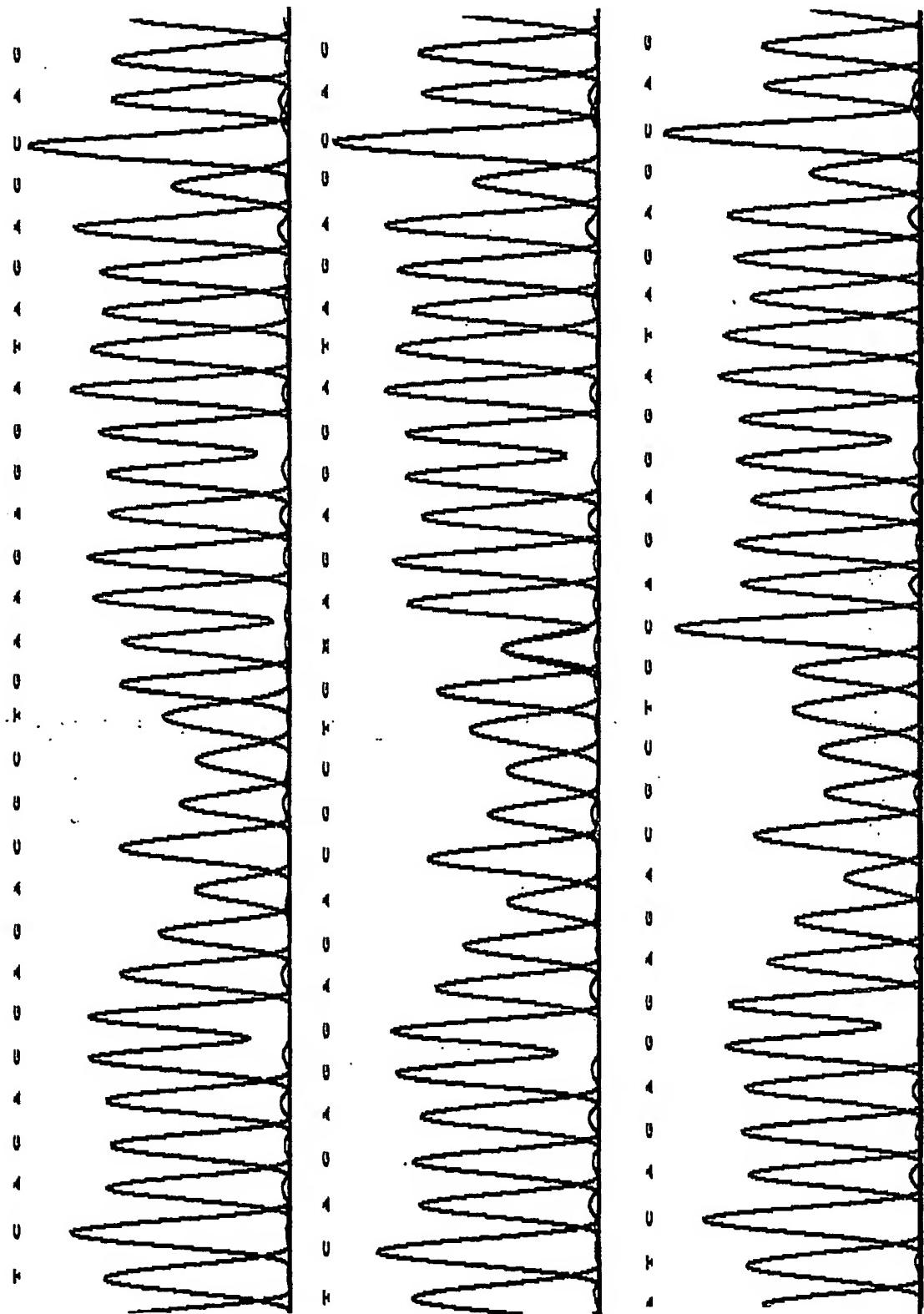
9.- Uso según la reivindicación 8, caracterizado porque el fármaco antitumoral es una combinación de cisplatino con un segundo compuesto antitumoral seleccionado entre gemcitabina, vinorelbina o docetaxel.



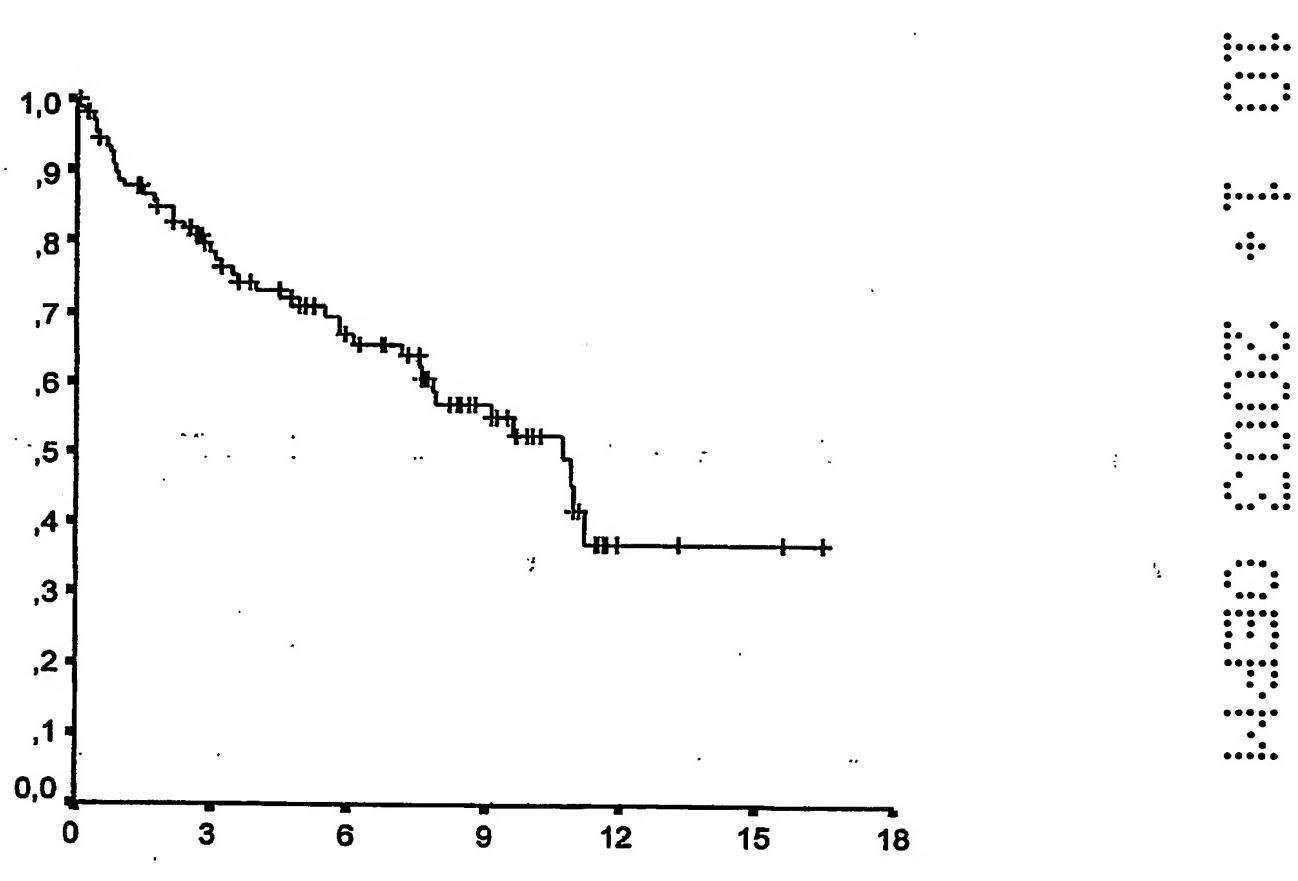
**FIG. 1**

1330 3002 + T OT

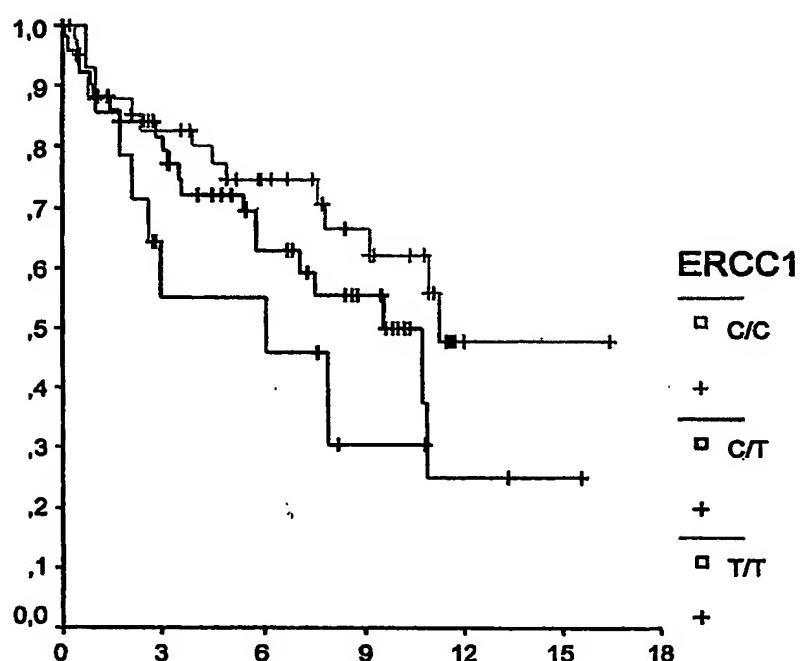
-24-



**FIG. 2**



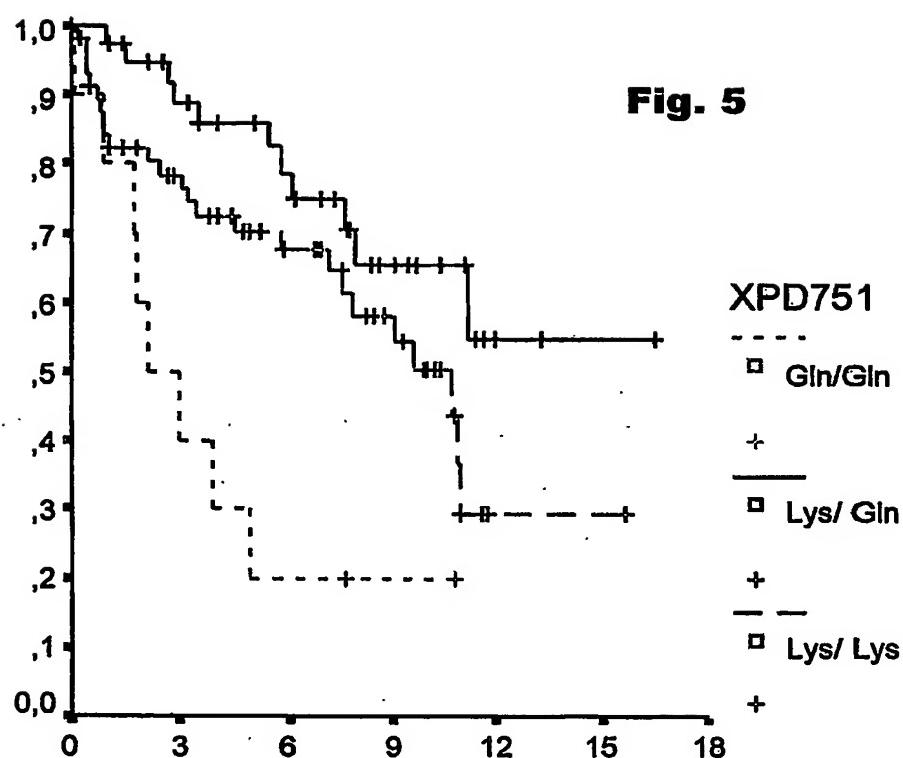
**FIG. 3**



**Fig. 4**

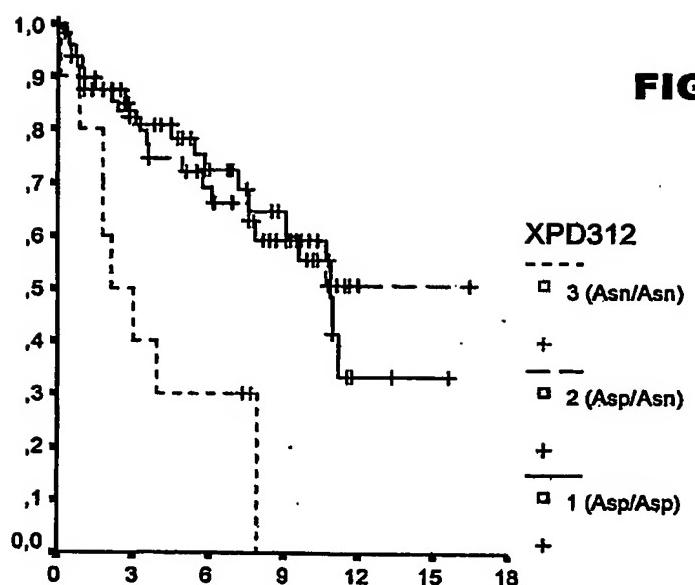
	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
T/T	14	6.1	0.5-11.8	0.12
C/T	52	9.6	6.4-12.8	
C/C	43	11.2	-	

Fig. 5

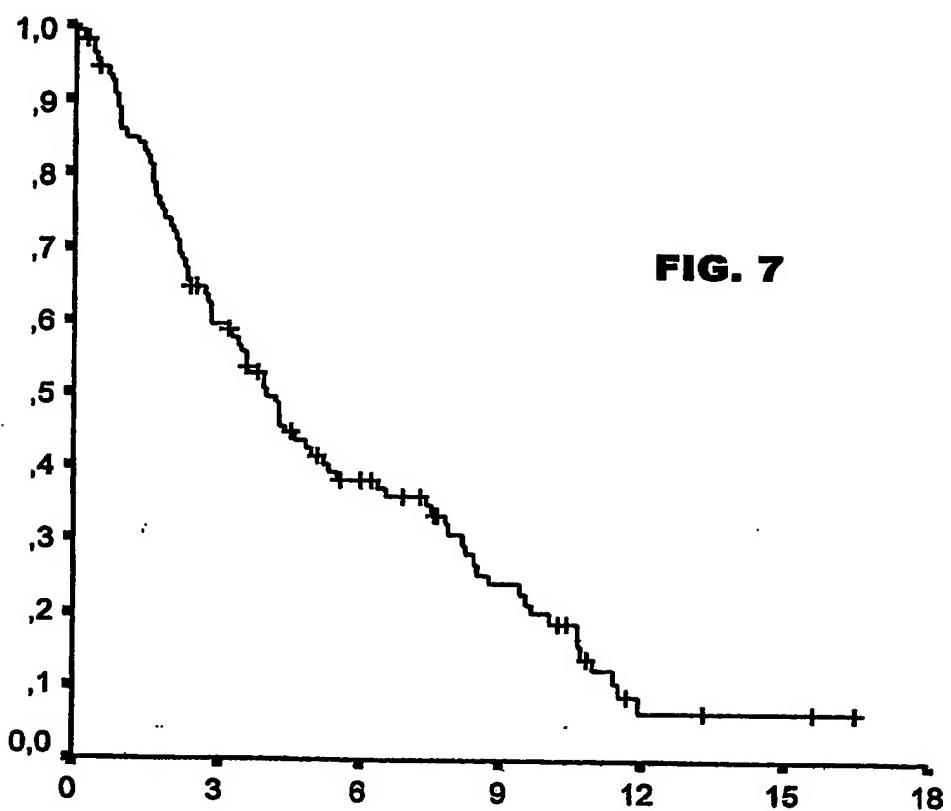


	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
Lys/Lys	59	10.7	7-14.4	0.0009
Lys/Gln	40	No alcanzada (not reached)		
Gln/Gln	10	2.1	0.3-3.9	

**FIG. 6**



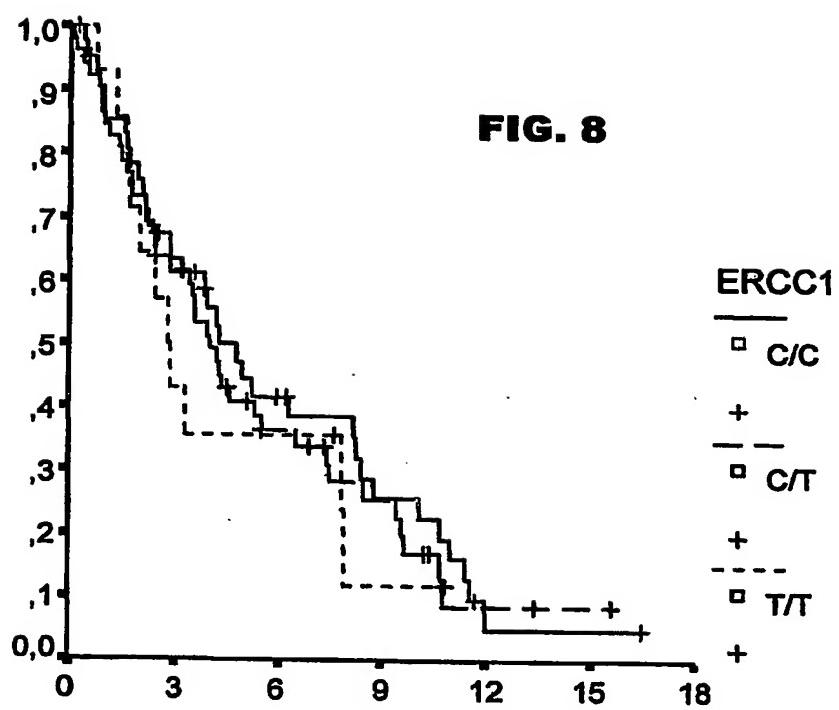
	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confiable 95%	Probabilidad
Asp/Asp	51	10.9	8.9-12.9	0.003
Asp/Asn	48	No alcanzada (not reached)		
Asn/Asn	10	2.1	0.3-3.9	



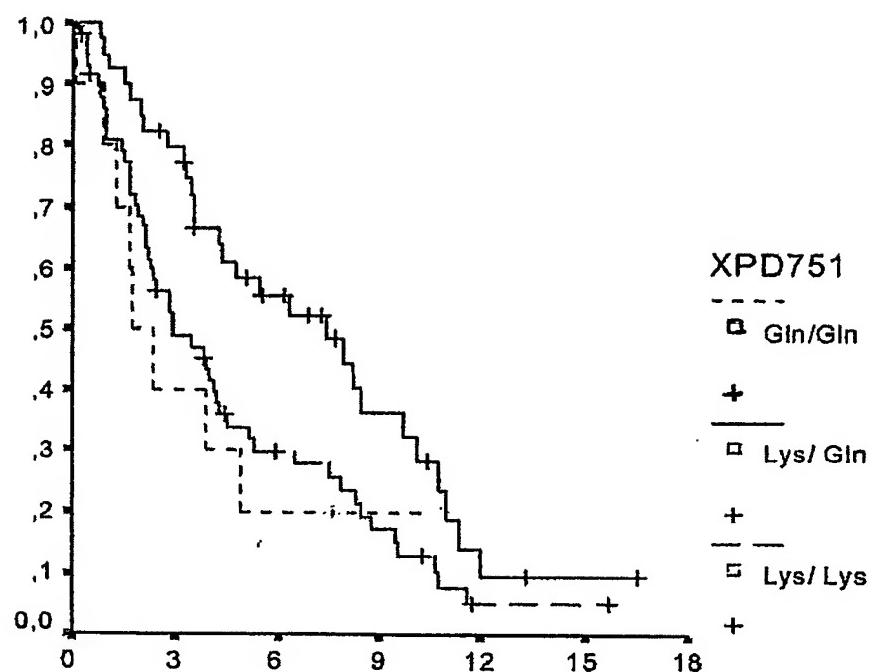
5  
4  
3  
2  
1  
0  
9  
8  
7  
6  
5  
4  
3  
2  
1  
0

**FIG. 7**

**FIG. 8**

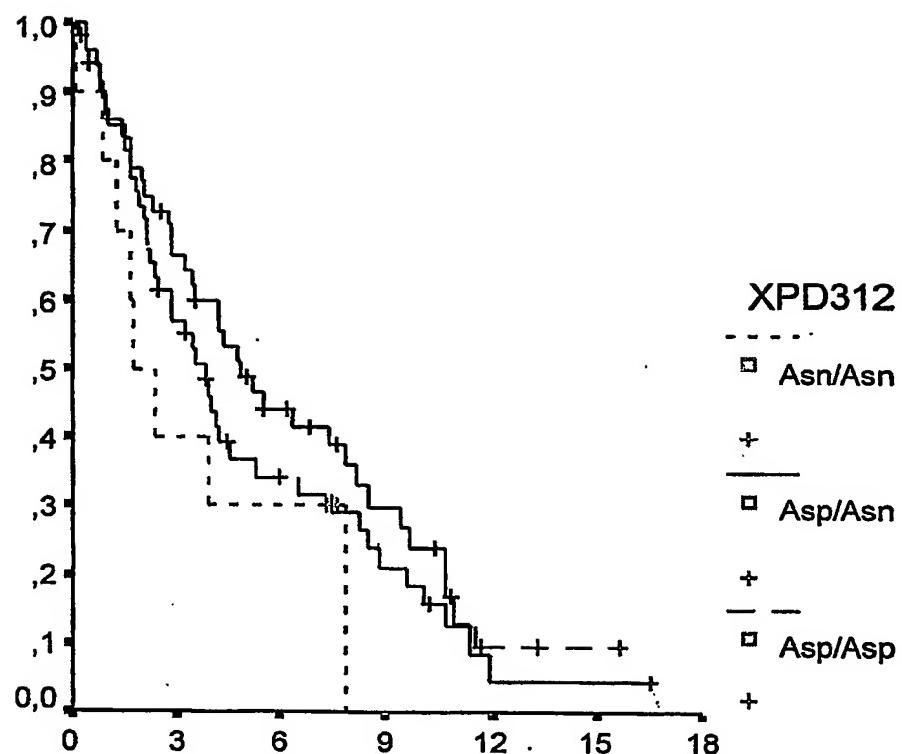


	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
T/T	14	2.7	1.9-3.6	0.75
C/T	52	4	3.1-4.9	
C/C	43	4.3	2.9-5.7	



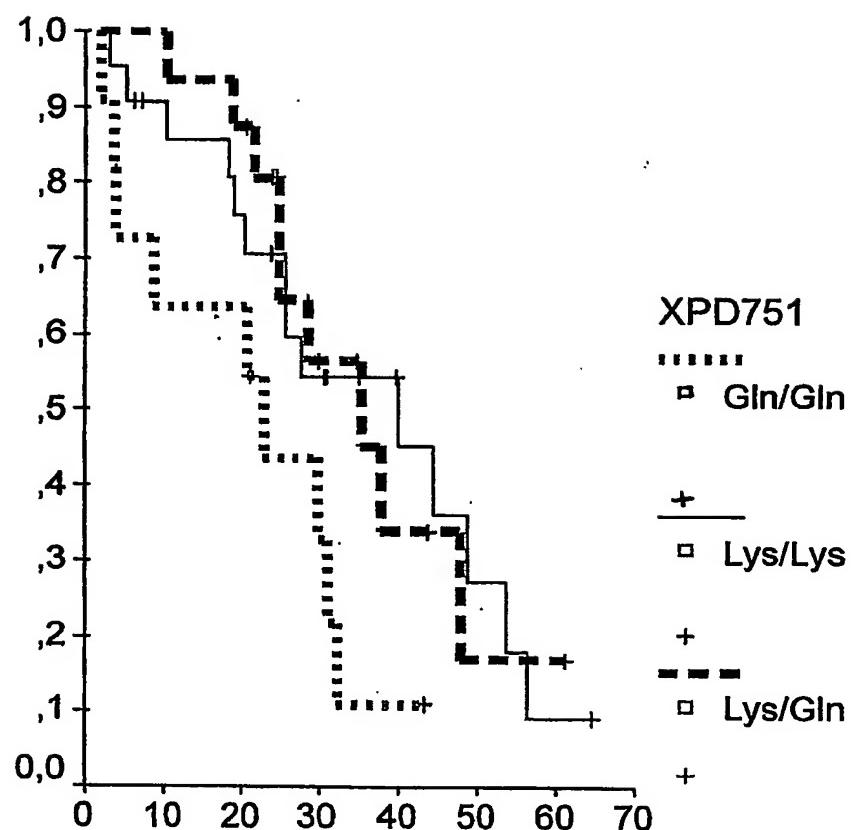
**FIG. 9**

	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo confianza 95%	Probabilidad
Lys/ Lys	59	2.9	1.3-4.4	0.03
Lys/ Gln	40	7.4	3.8-11	
Gln/ Gln	10	12.0	10.0-14.0	



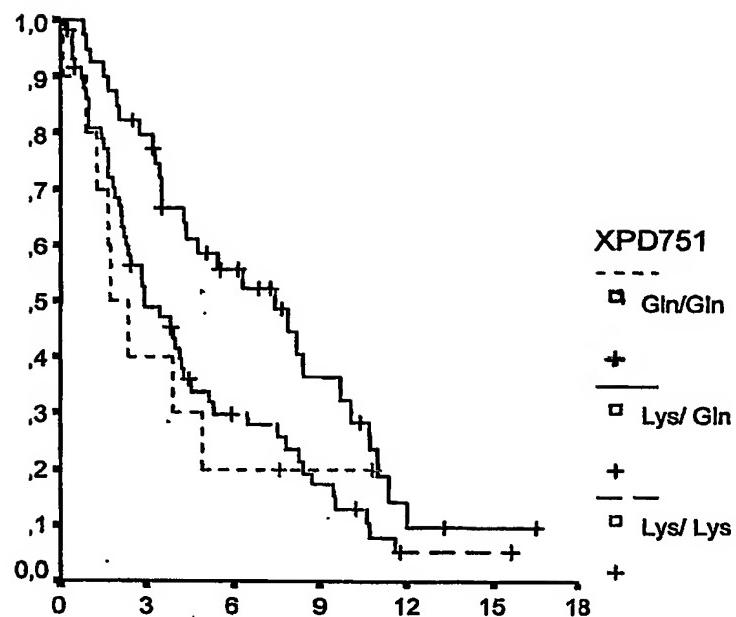
	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo confianza 95%	Probabilidad
Asp/Asp	51	3.8	2.6-5.1	0.32
Asp/Asn	48	4.9	3.4-6.4	
Asn/Asn	10	1.7	0.6-2.9	

**FIG. 10**



	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo confianza 95%	Probabilidad
Lys/Lys	22	10 mo	20.6-59.4	0.06
Lys/Gln	16	8.8 mo	23.8-47	
Gln/Gln	11	5.7 mo	1.3-44.7	

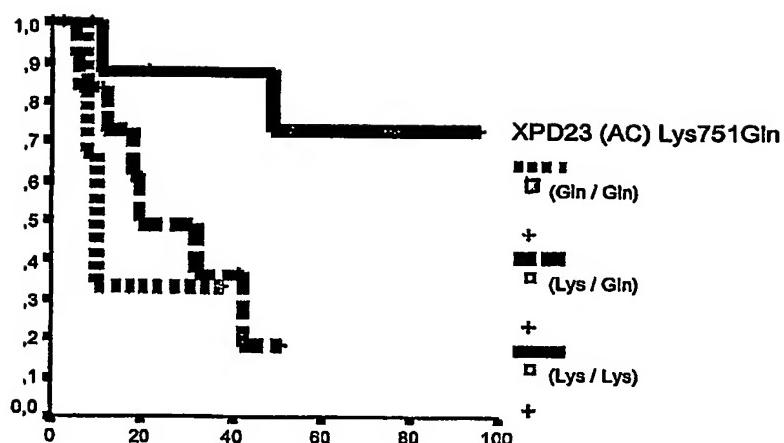
**FIG. 11**



	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo confianza 95%	Probabilidad
Lys/ Lys	59	2.9	1.3-4.4	0.03
Lys/ Gln	40	7.4	3.8-11	
Gln/ Gln	10	1.7	0.6-2.9	

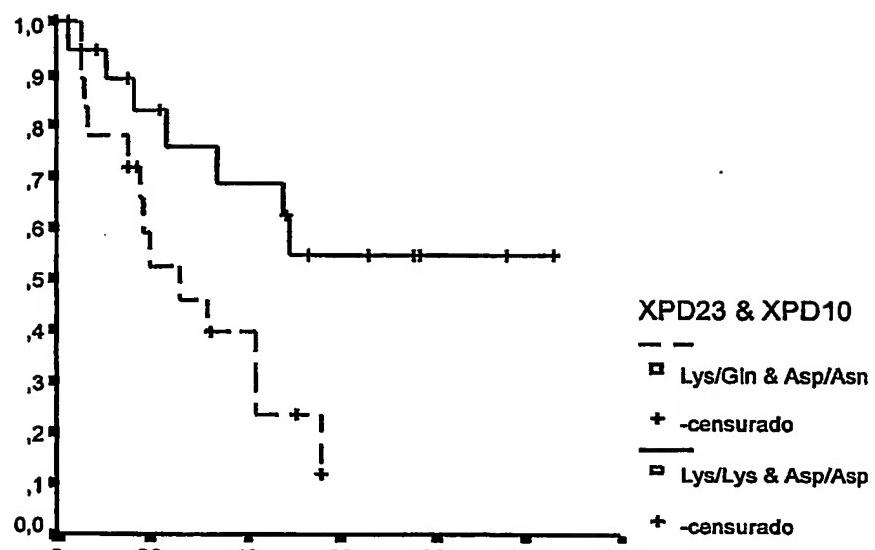
**FIG. 12**

IIIB



	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 85%	Probabilidad
Lys/Lys	13			0.04
Lys/Gln	12	4.9 mo	1.4-37.9	
Gln/Gln	3	2.4 mo	6.3-13.1	

**FIG. 13**



	Nº Pacientes	Mediana	Intervalo Confianza 95%	Probabilidad
Lys/Lys & Asp/Asp	23	No alcanzada (not reached)		0.02
Lys/Gln & Asp/Asn	18	6.4	2.4 – 10.4	

**FIG. 14**

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN CLINICA Y MOLECULAR DEL  
CANCER DE PULMON

<120> "DISPOSITIVO DE ENSAYO DE POLIMORFISMOS DEL GEN XPD/ERCC2  
PARA LA CORRECTA ADMINISTRACIÓN DE QUIMIOTERAPIA EN CANCER DE  
PULMON"

<130> P-99918

<160> 8

<210> SEQ ID NO.: 1

<211> 15

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

acgcccacacctggcca

15

<210> SEQ ID NO.: 2

<211> 17

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

ggcgggaaaggactgg

17

<210> SEQ ID NO.: 3

<211> 19

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGB<sup>TM</sup> VIC

<400>

ccgtgctgcccgacgaagt

19

.....  
O

<210> SEQ ID NO.: 4

<211> 19

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGB<sup>TM</sup> 6-FAM

<400>

ccgtgctgcccaacgaag

19

.....  
+  
M  
S  
G

9  
9  
2  
....

<210> SEQ ID NO.: 5

<211> 22

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

gcctggaggcagctagaatcaga

22

<210> SEQ ID NO.: 6

<211> 22

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<400>

cactcagagctgctgagcaatc

22

<210> SEQ ID NO.: 7

<211> 16

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGB<sup>TM</sup> VIC

<400>

tatccctctgcaggcgtc

16

<210> SEQ ID NO.: 8

<211> 17

<212> oligonucleótido

<213> secuencia artificial

<220>

<221> cebador

<223> Sonda Taqman MGB<sup>TM</sup> 6-FAM

<400>

ctatcccttcaggcgtc

17